

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
19. April 2001 (19.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/27295 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/75,
A61K 39/02, C12N 1/21

PASCHEN, Annette [DE/DE]; Scheffelstrasse 90, 68259
Mannheim (DE). CHAKRABORTY, Trinad [SG/DE];
Seltersweg 85, 35390 Giessen (DE). DOMANN, Eugen
[DE/DE]; Dreispitz 23, 35444 Biebertal (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/03629

(22) Internationales Anmeldedatum:
13. Oktober 2000 (13.10.2000)

(74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüttler,
Truderinger Strasse 246, 81825 München (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, CA, JP, NZ, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

(30) Angaben zur Priorität:
199 49 594.7 14. Oktober 1999 (14.10.1999) DE

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen.

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US*): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZEN-
TRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS
[DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg
(DE).

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): SCHADENDORF,
Dirk [DE/DE]; Weberstraße 3, 68165 Mannheim (DE).

(54) Title: RECOMBINANT ATTENUATED LISTERIAS FOR IMMUNOTHERAPY

WO 01/27295 A1

(54) Bezeichnung: REKOMBINANTE ATTENUIERTE LISTERIEN ZUR IMMUNTHERAPIE

(57) Abstract: The invention relates to listeria expression vectors for expressing the human tumor antigens tyrosinase, Trp-1, MelanA/MART-1 and Trp-2 or antigen epitopes derived therefrom, and to attenuated listeria bacteria containing these expression vectors, preferably bacteria of the listeria monocytogenes strain. These bacteria can be used for prophylactic, adjuvant or therapeutic immunotherapy, for example for treating malignant melanoma.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben werden Listeria-Expressionsvektoren, die die Expression der humanen Tumorantigene Tyrosinase, Trp-1, MelanA/MART-1 und Trp-2 oder davon abgeleiteter antigener Epitope erlauben, sowie diese Expressionsvektoren enthaltende, attenuierte Listeria-Bakterien, wobei es sich vorzugsweise um Bakterien des Stamms Listeria monocytogenes handelt. Diese Bakterien können zur prophylaktischen, adjuvanten oder therapeutischen Immuntherapie, beispielsweise zur Behandlung des malignen Melanoms verwendet werden.

Rekombinante attenuierte Listerien zur Immuntherapie

Die vorliegende Erfindung betrifft Listeria-
Expressionsvektoren, die die Expression der humanen
5 tumorassoziierten Antigene Tyrosinase, Trp-1, MelanA/MART-1
und Trp-2 erlauben, sowie diese Expressionsvektoren
enthaltende, attenuierte Listeria-Bakterien, wobei es sich
vorzugsweise um Bakterien des Stamms Listeria monocytogenes
handelt. Diese Bakterien können zur prophylaktischen,
10 adjuvanten oder therapeutischen Immuntherapie, beispielsweise
zur Behandlung des malignen Melanoms, verwendet werden.

Gegenwärtig stützt sich die Tumorthherapie im wesentlichen
immer noch auf die drei Hauptsäulen: Chirurgie, Chemo-,
15 adjuvante Chemo- und Radiotherapie. Allerdings haben diese
Therapien die folgenden gravierenden Nachteile: (a) Sie sind
im metastasierenden Krankheitsstadium bzw. als vorbeugende
Therapie nach Entfernung des Primärtumors kaum wirksam, d.h.
eine Heilung im Metastasierungsstadium ist nicht mehr möglich,
20 (b) sie sind im Bezug auf das klinische Ansprechen, auf die
Dauer des rezidivfreien Intervalls, die Gesamtüberlebenszeit
sowie die Lebensqualität des Patienten sehr unzureichend und
(c) sie weisen eine Reihe von teilweise schwerwiegenden
Nebenwirkungen auf, beispielsweise eine beträchtliche
25 Schädigung von normalem Gewebe. Darüberhinaus gibt es bisher
keine präventiven Möglichkeiten, die beispielsweise auf einer
"Schutzimpfung" beruhen könnten. Dies wäre aber gerade
hinsichtlich des malignen Melanoms sehr wünschenswert.

30 Somit liegt der Erfindung im wesentlichen das technische
Problem zugrunde, Mittel zur Tumorthherapie, insbesondere zur
Therapie des malignen Melanoms, bereitzustellen, die nicht die
vorstehend beschriebenen Nachteile der gegenwärtigen
Therapieverfahren ausweisen, insbesondere eine präventive
35 Anwendung erlauben, als Adjuvanz nach Entfernung eines

Primärtumors wirksam sind bzw. im Stadium der Fernmetastasierung von therapeutischem Nutzen sind.

5 Die Lösung dieses technischen Problems wurde durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen erreicht.

10 Bei den erfindungsgemäßen Listeria-Expressionsvektoren bzw. den rekombinanten attenuierten Listeria-Bakterien handelt es sich um gentherapeutisch wirksame Konstrukte, die zur prophylaktischen oder im Rahmen einer adjuvanten oder therapeutischen Tumorbekämpfung, beispielsweise beim malignen Melanom, eingesetzt werden können. Dabei kann durch eine vorzugsweise orale Immunisierung eine tumorspezifische
15 Immunantwort erzeugt, d.h. durch das körpereigene zelluläre Immunsystem kann eine gezielte Bekämpfung der Tumorzellen erreicht werden. Diese Behandlung kann außerdem bei Bedarf mit Behandlungsverfahren wie Chemotherapie oder Radiotherapie kombiniert werden, vorzugsweise ersetzt sie jedoch die
20 letzteren Therapieformen.

Die vorliegende Erfindung basiert auf dem Befund, daß mittels einer Immunisierung, vorzugsweise oralen Immunisierung, unter Verwendung der erfindungsgemäßen rekombinanten attenuierten
25 Listerien als Synthese- und Transportvehikel für tumorassoziierte Antigene eine prophylaktische bzw. therapeutische Behandlung von Tumoren möglich ist. Die Expression der einzelnen tumorassoziierten Antigene erfolgt dabei bevorzugt als Fusionsproteine, bei denen beispielsweise
30 eine Listerien-spezifische Signalsequenz an den N-Terminus des Antigens fusioniert ist. Nach Expression werden diese Fusionsproteine aus den Bakterienzellen in die Umgebung exportiert. Nach oraler Applikation passieren die Bakterien das mukosale Epithel des Intestinaltrakts im Bereich der
35 Peyerschen Plaques und werden durch die dort lokalisierten Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) des Immunsystems durch Phagocytose aufgenommen. Die Listerien liegen daher zunächst im Phagosom der infizierten Zelle vor, in das sie die

Fusionsproteine sekretieren, die damit einer Prozessierung zur Generierung von HLA Klasse I und HLA Klasse II Peptiden zur Verfügung stehen. Aufgrund des natürlichen Infektionszyklus können sowohl das Wildtyp-Listerien-Bakterium als auch definierte attenuierte Mutanten (sofern sie keine Deletion des hly Gens aufweisen) in das Cytosol der Zelle übertreten. Die ins Cytosol sekretierten Fusionsproteine sind wiederum einer Prozessierung zur Generierung von HLA-Klasse I Peptiden zugänglich. Die in beiden Zellkompartimenten (Phagosom und Cytosol) generierten Peptide stehen somit zur Beladung von HLA I bzw. HLA-Klasse II Molekülen zur Verfügung. Der Peptid-HLA-Komplex wird an der Zelloberfläche der APCs präsentiert und es wird eine spezifische T-Zellantwort (CD4+ und CD8+ T-Zellen) gegen die exprimierten tumorassoziierten Antigene induziert, d.h. eine zelluläre cytotoxische Immunantwort des körpereigenen Immunsystems gegen einen Tumor. Dadurch werden die Tumorzellen gezielt als entartet erkannt und abgetötet. Die Vorteile dieses Vorgehens liegen u.a. darin, daß das körpereigene Immunsystem gezielt in Richtung einer Zerstörung des Tumors mobilisiert wird. Es stellt ein einfaches Immunisierungsverfahren dar, da die APCs die tumorassoziierten Antigene mittels einer bakteriellen Infektion erhalten, d.h. bei dem erfindungsgemäßen Vorgehen ist keine arbeitsintensive ex vivo-Modifikation autologer APCs erforderlich, da ein natürlich vorkommender Infektionsprozess zur Modifizierung der Zellen des Immunsystems ausgenutzt wird.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung einen Listeria-Expressionsvektor zur Immuntherapie, wobei der Listeria-Expressionsvektor folgende DNA-Sequenzen funktionell verknüpft umfaßt: (a) einen in Listeria aktiven Promotor; und (b) eine für humane Tyrosinase, Trp-1, MelanA/MART-1 oder Trp-2 codierende DNA-Sequenz oder davon abgeleitete antigene Epitope.

35

Der hier verwendete Ausdruck "in Listeria aktiver Promotor" bezieht sich auf alle Promotoren, die in Listeria die Expression der tumorassoziierten Antigene erlauben.

Vorzugsweise handelt es sich dabei um Promotoren von *Listeria monocytogenes*-Genen, beispielsweise konstitutive oder unter den Bedingungen der Infektion aktivierte Promotoren. Besonders bevorzugt sind Promotoren, die zu einer starken Expression des gewünschten Antigens führen. Dieser Begriff bezieht sich auch auf Promotor-Fragmente oder Promotoren mit modifizierten Sequenzen, die noch biologisch aktiv sind. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Promotor für die *Listeria*-Expressionsvektoren um einen Promotor des *hly*-, *actA*, *plcA*, *plcB* oder *mpl*-Gens, die jeweils unter den Bedingungen der Infektion aktiv sind und die die *Listeria*-Proteine Haemolysin, ActA, Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C, Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C bzw. Metalloprotease codieren. Diese Promotoren sind bereits in der Literatur ausführlich beschrieben:

- *actA/plcB* Promotor: Domann et al., (1992), EMBO J. 11: 1981-1990 (Die Transkription des *actA* und des *plcB* Gens wird durch einen gemeinsamen Promotor gesteuert)
- *hly* Promotor: Domann et al., (1989), Nucleic Acids Res. 17: 6406
- *plcA* Promotor: Domann et al., (1991), Mol. Microbiol. 5: 361-366
- *mpl* Promotor: Domann et al., (1991), Infect. Immun. 59: 65-72

Der hier verwendete Ausdruck "für humane Tyrosinase, Trp-1, MelanA/MART-1 oder Trp-2 codierende DNA-Sequenz" betrifft jede DNA-Sequenz, die das native Protein ganz oder teilweise codiert. Diese DNA-Sequenzen sowie die abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind beispielsweise beschrieben in:

- humanes Tyrosinase-Gen: Genbank Accession Nr: M27160
 - humanes *trp-1* Gen: Genbank Accession Nr.: AF001295
 - humanes *trp-2* Gen: Genbank Accession Nr.: D17547
 - humanes MelanA/MART-1 Gen: Genbank Accession Nr.: U06452
- Hierzu wird außerdem auf die Figuren 1-4 verwiesen.

Bei den Antigenen Tyrosinase, Trp-1, Trp-2 und MelanA/MART-1

handelt es sich um Differenzierungsantigene melanocytären Ursprungs. Da diese Antigene ausschließlich in melanozytären Zellen (Melanocyten) im Rahmen der Melanogenese exprimiert werden, sind sie außerordentlich gut geeignet, um eine
5 spezifische Immunantwort gegen Melanomzellen zu generieren. Diese Differenzierungsantigene haben zudem den Vorteil, daß sie von bis zu 100% der Zellen eines pigmentierten Tumors (Melanom) exprimiert werden, wohingegen nur ca. 50% der Melanome Cancer-Testis Antigene, wie z.B. MAGE-1, exprimieren.
10 Die Enzyme Tyrosinase, Trp-1, Trp-2 katalysieren den Prozeß der Pigmentbildung (Malaninbiosynthese). Die Biosynthese findet in den spezifischen Organellen, den Melanosomen statt, in deren Matrix auch das MelanA/MART-1 Protein lokalisiert ist.

15

Der Ausdruck "für humane codierende DNA-Sequenz" betrifft darüber hinaus auch DNA-Sequenzen, die solche Formen von humaner Tyrosinase, Trp-1, MelanA/MART-1 bzw. Trp-2 codieren, die Veränderungen gegenüber der nativen Form, d.h.
20 beispielsweise Deletionen, Additionen oder Austausch von einer oder mehreren Aminosäuren und/oder (eine) modifizierte Aminosäure(n) oder die Anheftung eines Ubiquitin-Restes aufweisen oder veränderte Oligosaccharidseitenketten, wobei ihre antigenen Eigenschaften ganz oder teilweise bzw. in der
25 gewünschten Weise bleiben, d.h. sie weisen beispielsweise die in den nachstehenden Beispielen hinsichtlich der Behandlung eines Tumors beschriebenen Eigenschaften auf. Zu den Austauschen zählen vorzugsweise "konservative" Austausche von Aminosäureresten, d.h. Austausche gegen biologisch ähnliche
30 Reste, z.B. die Substitution eines hydrophoben Rests (z.B. Isoleucin, Valin, Leucin, Methionin) gegen einen anderen hydrophoben Rest, oder die Substitution eines polaren Rests gegen einen anderen polaren Rest (z.B. Arginin gegen Lysin, Glutaminsäure gegen Asparaginsäure etc.). Zu den Austauschen
35 zählen auch "nicht-konservative" Austausche, die die antigenen Eigenschaften der Proteine bzw. einzelner abgeleiteter Proteinfragmente (Peptide) erhalten oder sogar verstärken können. Dies kann durchaus die biologische bzw. enzymatische

- Aktivität des nativen Proteins verändern. Deletionen können zur Erzeugung von Molekülen führen, die eine deutlich geringere Größe aufweisen, d.h., denen beispielsweise Aminosäuren am N- oder C-Terminus fehlen. Die vorstehenden Varianten betreffen auch Varianten, die im Vergleich zu der ursprünglichen Form eine bessere Wirksamkeit hinsichtlich der Tumorbekämpfung aufweisen. Verfahren zur Erzeugung der vorstehenden Änderungen in der Aminosäuresequenz bzw. entsprechenden Nucleinsäuresequenz sind dem Fachmann bekannt und in Standardwerken der Molekularbiologie beschrieben, beispielsweise in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989). Der Fachmann ist auch in der Lage zu bestimmen, ob ein von einer so veränderten Nucleinsäuresequenz codiertes Protein bzw. Peptid noch über die erwünschten antigenen Eigenschaften der Tyrosinase, Trp-1, MelanA/MART-1 bzw. Trp-2 (ganz oder teilweise) verfügt. Diese antigenen Eigenschaften lassen sich für die Proteine/Peptide anhand der Stimulierung Antigen-spezifischer cytotoxischer T-Zelllinien feststellen. Im Falle der Peptide bietet sich außerdem eine Überprüfung ihrer HLA-Bindungseigenschaften im Rahmen von FACS Analysen an. Vorzugsweise sollten die Tyrosinase, Trp-1, MelanA/MART-1, Trp-2 bzw. die vorstehenden Varianten codierenden DNA-Sequenzen eine Transkriptionsterminationssequenz und eine Translationsterminationssequenz zur Gewährleistung einer stabilen und korrekten Transkription bzw. Translation aufweisen.
- Allgemeine, auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren können zur Konstruktion der erfindungsgemäßen Listeria-Expressionsvektoren, u.a. zur Ligation der Fragmente für den Promotor und die tumorassoziierten Antigene und Insertion in den Vektor, verwendet werden. Zu diesen Verfahren zählen beispielsweise in vitro-Rekombinationstechniken, synthetische Verfahren, sowie in vivo-Rekombinationsverfahren, wie sie beispielsweise in Ausubel und Frederick (1991), Current Protocols in Molecular Biology (J.Wiley & Sons, New York)

beschrieben sind.

Am meisten bevorzugt sind Listeria-Expressionsvektoren, bei denen die für humane Tyrosinase, Trp-1, MelanA/MART-1 bzw. Trp-2 codierende DNA-Sequenz mit einer ein Listeria-Protein(fragment) codierenden DNA-Sequenz so verknüpft ist, daß ein Fusionsprotein codiert wird. Vorzugsweise stellt der von dem Listeria-Protein stammende Anteil den N-terminalen Anteil des Fusionsproteins dar. Verschiedene Listeria-Proteine bzw. Fragmente davon sind zur Herstellung dieses Fusionsprotein geeignet, beispielsweise die vorstehend hinsichtlich der Listeria-Promotoren offenbarten Gene. Noch mehr bevorzugt sind Listeria-Expressionsvektoren, bei denen der Listeria-Protein-Anteil des Fusionsproteins von einem an der Lyse der Wirtsvakuolen oder an Bewegungen der Bakterien in der Wirtszelle beteiligten Protein stammt, vorzugsweise Listeriolysin O (Lyse), ActA (intrazelluläre Bewegung) oder PI-PLC (Lyse). Der Vorteil von Listeriolysin O, eine Listeria-Phospholipase oder das ActA-Protein zur Konstruktion von Fusionsproteinen einzusetzen, liegt darin, daß diese Proteine sekretiert werden. Im Falle einer Infektion gelangen diese Fusionsproteine daher bevorzugt ins Phagolysosom bzw. ins Cytosol der infizierten Zelle, d.h. in die Zellkompartimente, in denen die Generierung von HLA-Klasse I und HLA-Klasse II präsentierten Peptiden stattfindet. Die Fusionsproteine können vorzugsweise wie folgt aussehen:

- a) lediglich die sekretorische Signalsequenz eines Listerien-spezifischen Proteins wird mit dem Antigen fusioniert
- b) die sekretorische Signalsequenz inklusive eines Ausschnitts der sich daran anschließenden nativen Proteinsequenz wird mit dem Antigen fusioniert,
- c) ein kurzes Fragment des Antigens wird unter Aufrechterhaltung des Leserahmens in die Sequenz des genannten Listerien-Proteins eingebaut.

Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung Listeria-Expressionsvektoren, bei denen der Listeria-Protein-Anteil des

Fusionsproteins eine Signalsequenz eines sezernierten Listeria-Proteins umfaßt. Vorzugsweise stammt die Signalsequenz vom Listeria-Haemolysin, einer Listeria-Phospholipase oder dem ActA-Protein.

5

Ausgangsvektor für die Herstellung des erfindungsgemäßen Listeria-Expressionsvektor ist jeder Vektor, der in Listeria zur Expression der gewünschten Antigene führt. Dabei kann es sich um einen autosomalen oder stabil in das Listeria-Genom inserierenden Vektor handeln. Vorzugsweise ist der Ausgangsvektor ein "Shuttle"-Vektor, der sich in einem weiteren Wirt, beispielsweise E. coli, vermehren läßt. Derartige Vektoren sind beispielsweise pKSV7 (Frankel et al., 1995, J. Immunol. 155: 4775-4782), pCGU34 (Paglia et al., 1997, Eur. J. Immunol. 27: 1570-1575), pAUL-A (Niebuhr et al., 1997, EMBO J. 16: 5444-5445) und pLIGA160.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die erfindungsgemäßen Listeria-Expressionsvektoren (autosomal oder stabil in das Genom integriert, beispielsweise über homologe Rekombination) enthaltende rekombinante, attenuierte Listeria-Bakterien, vorzugsweise Listeria monocytogenes oder Listeria innocua, wobei letzterer sich insbesondere zur Verstärkung einer Immunantwort eignet. Die Auswahl geeigneter Listerien kann für den Fachmann nach üblichen Kriterien hinsichtlich des Einsatzes von Bakterien für die Vakzinierung erfolgen, d.h. die für die erfindungsgemäßen Zwecke verwendbaren Listerien sollten über Immunogenizität verfügen, jedoch ausreichend attenuiert sein, um die sichere Anwendung beim Menschen zu erlauben. Dazu ist es nötig, daß der Mutantenphänotyp der Listerien absolut stabil ist, was üblicherweise nur durch die Erzeugung chromosomaler Deletionen möglich ist. Zu den Beispielen für attenuierte Mutanten zählen Mutanten, die hinsichtlich der Ausbreitung von Zelle zu Zelle defizient sind, actA-negative Mutanten, die hinsichtlich des intrazellulären Wachstums defizient sind, hly2- (Listeriolysin)-negative Mutanten, sowie Mutanten, die zumindest hinsichtlich eines Phospholipase-Gens defizient sind

35

- (Guzmán et al., Infect. Immun. 63 (1995), 3665-3673). Zu den Beispielen für geeignete Listeria-Stämme zählen die Δ mpl2-Mutante (Paglia et al., Eur. J. Immunol. 27: 1570-1575). Geeignete attenuierte Listeria-Stämme sind auch in der internationalen Patentanmeldung PCT/EP98/08096 beschrieben. Verfahren zur Transformation der vorstehenden Listerien mit den erfindungsgemäßen Listeria-Expressionsvektoren, beispielsweise Elektroporation, zur phänotypischen Selektion von Transformanten und zur Expression der die tumorassoziierten Antigene (gegebenenfalls als Fusionsproteine) codierenden DNA-Sequenzen unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Listeria-Expressionsvektoren sind auf dem Fachgebiet bekannt.
- Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung ferner ein die erfindungsgemäßen rekombinanten attenuierten Listeria-Bakterien enthaltendes Arzneimittel (Impfstoff) bzw. deren Verwendung zur Immuntherapie. Diese Immuntherapie eignet sich zur Behandlung pigmentierter Tumorarten, vorzugsweise zur Therapie des malignen Melanoms oder des malignen Schwannoms (Untergruppe der Neuroblastome). Diese Arzneimittel enthalten gegebenenfalls zusätzlich einen pharmazeutisch verträglichen Träger. Geeignete Träger und die Formulierung derartiger Arzneimittel sind dem Fachmann bekannt. Zu geeigneten Trägern zählen beispielsweise Phosphat-gepufferte Kochsalzlösungen, Wasser, Emulsionen, beispielsweise Öl/Wasser-Emulsionen, Netzmittel, sterile Lösungen etc.. Das erfindungsgemäße Arzneimittel kann beispielsweise zur oralen Verabreichung in Form eines Elixiers, einer Kapsel oder Suspension verabreicht werden. Die geeignete Dosierung und die Art der Verabreichung, vorzugsweise orale, intravenöse oder intraperitoneale Verabreichung werden von dem behandelnden Arzt bestimmt und hängen von verschiedenen Faktoren ab, beispielsweise von dem Alter, dem Geschlecht, dem Gewicht des Patienten, dem Stadium und Schweregrad des Tumors, der Art der Verabreichung etc.. Jedenfalls muß die Verabreichung in einer wirksamen Menge erfolgen, d.h. einer Menge, daß das tumorassoziierte Antigen in einer Menge exprimiert wird, daß eine Immunantwort in T-

Zellen gegenüber dem tumorassoziierten Antigen induziert wird, so daß dieses Antigen enthaltende Zellen zerstört werden. Das erfindungsgemäße Arzneimittel kann entweder allein verabreicht werden oder in Kombination mit weiteren Tumorthérapien.

5

Erfindungsgemäße Expressionsvektoren wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Mascheroder Weg 1b, Braunschweig jeweils am 5. Oktober 1999 nach den Bestimmungen des Budapester Vertrags hinterlegt. Die hinterlegten Proben haben folgende Hinterlegungsnummern erhalten:

10

Escherichia coli XL2-Blue pLIGA-trp2 DSM 13072

Escherichia coli XL2-Blue pLIGA-tyro DSM 13073

Escherichia coli XL2-Blue pLIGA-trp1 DSM 13074

15

Die Figuren erläutern weiter die Erfindung.

Fig. 1: Darstellung der cDNA-Kodierregion von menschl. Tyrosinase und der daraus abgeleiteten Proteinsequenz

20

Fig. 2: Darstellung der cDNA-Kodierregion von menschl. Trp-1 und der daraus abgeleiteten Proteinsequenz

Fig. 3: Darstellung der cDNA-Kodierregion von menschl. Trp-2 und der daraus abgeleiteten Proteinsequenz

25

Fig. 4: Darstellung der cDNA-Kodierregion von menschl. MART-1/MelanA und der daraus abgeleiteten Proteinsequenz

30

Fig. 5: Analyse der Oberflächenmarker infizierter dendritischer Zellen
Die Expression der Oberflächenmarker nicht mit L. monocytoenes Bakterien infizierter dendritischer Zellen (dünne Linien) sowie die infizierter dendritischer Zellen (dicke Linien) wurden analysiert. Schattierte graue Histogramme

35

repräsentieren die Kontrollen

Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung.

5 **Beispiel 1: Herstellung zweier verschiedener die humane
Tyrosinase exprimierender Listeria-
Expressionsvektoren**

10 Am 5'- und am 3'-Ende der für die menschliche tumorassoziierte
Tyrosinase-Antigen codierenden cDNA (Genbank-Zugangsnummer:
M27160) wurden mittels PCR (s. Tabelle 1) unter Verwendung der
in Tab. 1 und 2 angegebenen spezifischen Primer (tyr-5/2-
LIGA+tyr/3-LIGA ; tyr/5-LIGA+tyr/3-LIGA) eine NdeI bzw. eine
15 SalI-Erkennungssequenz eingeführt. Die Primerkombination tyr-
5/2-LIGA und tyr/3-LIGA (Tab. 1) wurde zur Amplifizierung der
vollständigen Tyrosinase cDNA-Sequenz eingesetzt. Die
Primerkombination tyr/5-LIGA und tyr/3-LIGA (Tab. 2) wurde zur
Amplifizierung einer 5'-deletierten Tyrosinase cDNA-Sequenz
eingesetzt. Beide PCR-Amplifikate wurden dann wie folgt
20 behandelt: Unter Ausnutzung der genannten
Restriktionsschnittstellen wurde das Fragment in den Vektor
pLIGA160 in frame stromabwärts der plasmidkodierten actA-
Signalsequenz kloniert. Die Expression des resultierenden
Fusionsgens wird durch den plasmidkodierten actA-Promotor
25 gesteuert (Domann et al., 1992, EMBO J. 11: 1981-1990; Genbank
Accession: X59723). Die inserierte DNA-Sequenz sowie deren
Übergangstellen zum Vektor wurden zur Kontrolle sequenziert.
Der resultierende Expressionsvektor erhielt die Bezeichnung
pLIGA-tyrof (codiert gesamte Tyrosinase cDNA) bzw. pLIGA-tyro
30 (codiert 5'-deletierte Tyrosinase cDNA). Letzterer wurde bei
der DSMZ am 5. Oktober unter der Nummer DSM 13073 hinterlegt.

35 **Beispiel 2: Herstellung zweier verschiedener das humane trp-1
Protein exprimierender Listeria-
Expressionsvektoren**

Am 5'- und am 3'-Ende der für das menschliche tumorassoziierte

Trp-1 Antigen codierenden cDNA (Genbank-Zugangsnummer: AF001295) wurden mittels PCR (s. Tabelle 1) unter Verwendung der in Tab. 1 und 2 angegebenen spezifischen Primer (trp1-5/2-LIGA+trp1/3-LIGA ; trp1/5-LIGA+trp1/3-LIGA) eine NdeI bzw.
5 eine Bgl II Erkennungssequenz eingeführt. Die Primerkombination trp1-5/2-LIGA und trp1/3-LIGA (Tab. 1) wurde zur Amplifikation der vollständigen trp-1 cDNA-Sequenz eingesetzt. Die Primerkombination trp1/5-LIGA und trp1/3-LIGA (Tab. 2) wurde zur Amplifikation einer 5'-deletierten trp-1
10 cDNA-Sequenz eingesetzt. Beider PCR-Amplifikate wurden dann wie folgt behandelt: Unter Ausnutzung der genannten Restriktionsschnittstellen wurde das Fragment in den Vektor pLIGA160 in frame stromabwärts der plasmidkodierten actA-Signalsequenz kloniert. Die Expression des resultierenden
15 Fusionsgens wird durch den plasmidkodierten actA-Promotor gesteuert (Domann et al., 1992, EMBO J. 11: 1981-1990; Genbank Accession: X59723) Die inserierte DNA-Sequenz sowie deren Übergangsstellen zum Vektor wurden zur Kontrolle sequenziert. Der resultierende Expressionsvektor erhielt die Bezeichnung
20 pLIGA-trp1f (codiert die gesamte trp-1 cDNA) bzw. pLIGA-trp1 (codiert 5'-deletierte trp-1 cDNA). Letzterer wurde am 5. Oktober 1999 bei der DSMZ Braunschweig unter DSM 13074 hinterlegt.

25

Beispiel 3: Bereitstellung zweier verschiedener das humane trp-2-Protein exprimierender Listeria-Expressionsvektoren

30

Am 5'- und am 3'-Ende der für das menschliche tumorassoziierte Trp-2 Antigen codierenden cDNA (Genbank-Zugangsnummer: D17547) wurden mittels PCR (s. Tabelle 1) unter Verwendung der in Tabelle 1 und 2 angegebenen spezifischen Primer (trp2-5/2-LIGA+trp2/3-LIGA ; trp2/5-LIGA+trp2/3-LIGA) eine NdeI bzw.
35 eine Sal I Erkennungssequenz eingeführt. Die Primerkombination trp2-5/2-LIGA und trp2/3-LIGA (Tab. 1) wurde zur Amplifikation der vollständigen trp-2 cDNA-Sequenz eingesetzt. Die Primerkombination trp2/5-LIGA und trp2/3-LIGA (Tab. 2) wurde

zur Amplifizierung einer 5'-deletierten trp-2 cDNA-Sequenz eingesetzt. Beide PCR-Amplifikate wurde dann wie folgt behandelt: Unter Ausnutzung der genannten Restriktionsschnittstellen wurde das Fragment in den Vektor pLIGA160 in frame stromabwärts der plasmidkodierten actA-Signalsequenz kloniert. Die Expression des resultierenden Fusionsgens wird durch den plasmidkodierten actA-Promotor gesteuert (Domann et al., 1992, EMBO J. 11: 1981-1990; Genbank Accession: X59723) Die inserierte DNA-Sequenz sowie deren Übergangsstellen zum Vektor wurden zur Kontrolle sequenziert. Der resultierende Expressionsvektor erhielt die Bezeichnung pLIGA-trp2f (codiert die gesamte trp-2 cDNA) bzw. pLIGA-trp2 (codiert 5'-deletierte trp-2 cDNA). Letzterer wurden am 5. Oktober 1999 bei der DSMZ Braunschweig unter DSM 13072 hinterlegt.

Beispiel 4: Herstellung eines das humane MelanA/MART-1 Gen exprimierenden Listeria-Expressionsvektors

Am 5'- und am 3'-Ende der für das menschliche tumorassoziierte MelanA-Antigen codierenden cDNA (Genbank-Zugangsnummer: U06452) wurden mittels PCR (s. Tabelle 1) unter Verwendung der in Tabelle 1 angegebenen Primer (melanA-5/2-LIGA, melanA/3-LIGA) eine NdeI bzw. eine Bgl II Erkennungssequenz eingeführt. Unter Ausnutzung der Restriktionsschnittstellen wurde das Fragment in den Vektor pLIGA160 in frame stromabwärts der plasmidkodierten actA-Signalsequenz kloniert. Die Expression des resultierenden Fusionsgens wird durch den plasmidkodierten actA-Promotor gesteuert (Domann et al., 1992, EMBO J. 11: 1981-1990; Genbank Accession: X59723) Die inserierte DNA-Sequenz sowie deren Übergangsstellen zum Vektor wurden zur Kontrolle sequenziert.

Beispiel 5: Antigen-Expression in *Listeria monocytogenes*

Die in den vorstehenden Beispielen 1 bis 4 beschriebenen *Listeria*-Expressionsvektoren wurde nach Amplifikation in dem E.coli-Stamm XL2-Blue jeweils in den *L. monocytogenes* Stamm EGD sowie in die attenuierten Mutanten Δ hly2 und Δ actA (Guzmann et al., 1995, Infect. Immun. 63: 3665-3573) mittels Elektroporation eingeführt. Die dazu angewandte Technik ist dem Fachmann hinreichend bekannt. Plasmidtragende Listerien wurden anhand der plasmidvermittelten Erythromycin-Resistenz identifiziert. Die Expression der tumorassoziierten Antigene wird dann unter Anwendung immunologischer Nachweisverfahren (z.B. immunologische Färbung, Western Blot) mittels spezifischer Antikörper (MelanA-AK erhältlich von Fa. Novocastra; Tyrosinase-AK erhältlich von Fa. BioTrend, Köln; Trp-1 AK beschrieben in Thomsen et al, 1985, J. Invest. Dermatol. 85: 169-174) bestimmt. Jedes der tumorassoziierten Antigene konnte nachgewiesen werden, d.h. der gewählte Expressionsweg war erfolgreich.

Beispiel 7: Immunisierung von Mäusen des transgenen Mäusestamms HLA-A2

Der im vorstehenden Beispiel 4 beschriebene *Listeria*-Expressionsvektor pLIGA-MelanA wurde nach Amplifikation im E.coli-Stamm XL2-Blue in den *L. monocytogenes* Stamm EGD (Guzman et al., 1995, Infect. Immun. 63: 3665-3573) mittels Elektroporation eingeführt. Diese Bakterien wurden über Nacht bei 37°C in BHI (Brain-Heart-Infusion)-Medium (Hersteller: Fa. Difco) angezüchtet. Es wurde eine 1:50 Verdünnungskultur angelegt und das Wachstum der Bakterien bis zur mittleren log-Phase fortgesetzt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 3000xg geerntet. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und in PBS resuspendiert. Zur Kontrolle wurden die das nicht-veränderte Plasmid pLIGA160 tragenden EGD-Bakterien ebenso behandelt und kultiviert.

Mäuse vom transgenen Stamm HLA-A2k^b (Vitiello et al., 1991, J. Exp. Med. 173: 1007-1015) wurden mit den in PBS resuspendierten Bakterien (EGD-pLIGA-MelanA und EGD-pLIGA160) im 7-tägigen Intervall immunisiert. Die Mäuse erhielten
 5 jeweils eine orale Applikation von 1×10^6 Bakterien an Tag 0 und 1×10^7 Bakterien an Tag 7, 14, 21, usw.

Primäres Ziel der Immunisierungsexperimente ist die Erzeugung einer zellulären cytotoxischen T-Zellantwort. Die Antigen-spezifische Aktivität cytotoxischer T-Zellen gilt als
 10 Grundlage einer effizienten antitumorösen Immunantwort.

Die Milzen von je 3 immunisierten Mäusen werden 7 Tage nach der letzten Immunisierung entnommen, gepoolt und mechanische
 15 bearbeitet, daß eine Einzelzellsuspension vorliegt. Die Milzzellen werden mit einer zur HLA-A2k^b transgenen Zelllinie (C1R-A2k^b) restimuliert. Diese Zelllinie ist mit dem MelanA-Antigen kodierenden Gen stabil transfiziert und kann daher zur Stimulierung der cytotoxischen Aktivität Antigen-spezifischer
 20 T-Zellen eingesetzt werden. Nach 5-7 Tagen werden die lebenden Zellen geerntet und im dem Fachmann hinreichend bekannten ⁵¹Cr-Freisetzungsexperiment auf ihre Fähigkeit hin überprüft, die genannten Antigen-exprimierenden Zielzellen zu lysieren.

25

L. monocytogenes EGD	% Spezifische Lyse der MelanA-exprimierenden C1R-A2k ^b Zielzellen Effektor:Target Verhältnis		
	50:1	25:1	10:1
pLIGA-MelanA	30	25	18
pLIGA160	2	0	0

30

35

Dargestellt ist die MHC-Klasse I Melan A restringierte Lyse von MelanA exprimierenden C1R-A2k^b Zielzellen durch Lymphocyten die in vivo mit dem rekombinanten L. monocytogenes EGD pLIGA-MelanA Vakzinestamm primär stimuliert wurden. 7 Tage nach der letzten Immunisierung mit EGD-pLIGA-MelanA bzw. EGD-pLIGA160 (Negativkontrolle) wurden die Milzzellen an Tag 5 nach Entnahme in vitro restimuliert. Zur in vitro Restimulierung wurde die zum immunisierten HLA-A2k^b transgenen Mausstamm syngene C1R-A2k^b Zelllinie, die stabil mit dem humanen MelanA kodierenden Gen transfiziert wurde, eingesetzt. Zum Ende der Kultur wurden die Lymphocyten im ⁵¹Cr-Freisetzungsexperiment auf ihre Fähigkeit zur Lyse der C1R-A2k^b MelanA transfizierten Zelllinie hin getestet.

EGD-pLIGA160: Negativkontrolle

Tabelle 1

Primer zur Amplifizierung der vollständigen Antigen-kodierenden c-DNA

c-DNA	Primer
Tyrosinase	tyr-5/2-LIGA 5' - ccg aca cat atg <u>ctc ctg gct gtt ttg tac tgc ctg</u> - 3' NdeI
	tyr/3-LIGA 5' - ccg aca gtc gac <u>tta taa atg gct ctg ata caa gct gt-</u> 3' SalI
Trp-1	trp1-5/2-LIGA 5' - ccg aca cat atg <u>agt gct cct aaa ctc ctc tct ctg</u> - 3' NdeI
	trp1/3-LIGA 5' - ccg aca aga tct <u>tta qac cac aga ctg att agg att ct-</u> 3' BglII
Trp-2	trp2-5/2-LIGA 5' - ccg aca cat atg <u>agg ccc ctt tgg tgg ggg ttt ctg</u> - 3' NdeI
	trp2/3-LIGA 5' - ccg aca gtc gac <u>cta ggc ttc ttc tgt gta tct ctt gc-</u> 3' SalI
MelanA	melanA-5/2-LIGA 5' - ccg aca cat atg <u>cca aga gaa gat gct cac ttc atc</u> - 3' NdeI
	melanA/3-LIGA 5' - ccg aca aga tct <u>tta agg tga ata agg tgg tgg tga-</u> 3' BglII

Tab. 1: Primer zur Amplifizierung der Antigen kodierenden c-DNA Sequenzen.
Fett markiert ist jeweils die Erkennungssequenz spezifischer Restriktionsenzyme, die für die Klonierung des PCR-Amplifikats in den Vektor pLIGA160 eingesetzt wurden. Unterstrichen ist der Anteil eines Primers, der an die komplementäre Sequenz der genannten c-DNA bindet.

PCR Bedingungen zur Amplifizierung der genannten c-DNA Fragmente:

- Initiale Denaturierung: 3 Min. bei 94°C
- Zyklus (40 X): 0,5 Min. bei 94°C
1 Min. bei 55°C
1,5 Min. bei 68°C
- abschließende Polymerisation: 7 Min. bei 68°C

Tabelle 2Primer zur Amplifizierung der 5'-verkürzten Antigen-kodierenden c-DNA

c-DNA	Primer
Tyrosinase	tyr/5-LIGA 5' - ccg aca cat atg <u>ggc cat ttc cct aga gcc tgt gtc tc</u> - 3' NdeI
	tyr/3-LIGA 5' - ccg aca gtc gac <u>tta taa atg gct ctg ata caa gct gt</u> - 3' SalI
Trp-1	trp1/5-LIGA 5' - ccg aca cat atg <u>caa ttc cca aga caa tgt gcc act gt</u> - 3' NdeI
	trp1/3-LIGA 5' - ccg aca aga tct <u>tta gac cac aga ctg att agg att ct</u> - 3' BglII
Trp-2	trp2/5-LIGA 5' - ccg aca cat atg <u>caq ttc ccc cga gtc tgc atg acg gt</u> - 3' NdeI
	trp2/3-LIGA 5' - ccg aca gtc gac <u>cta ggc ttc ttc tgt gta tct ctt gc</u> - 3' SalI

Tab. 2: Primer zur Amplifizierung der Antigen kodierenden 5'- deletierten c-DNA Sequenzen

Fett markiert ist jeweils die Erkennungssequenz spezifischer Restriktionsenzyme, die für die Klonierung des PCR-Amplifikats in den Vektor pLIGA160 eingesetzt wurden. Unterstrichen ist der Anteil eines Primers, der an die komplementäre Sequenz der genannten c-DNA bindet.

PCR Bedingungen zur Amplifizierung der genannten c-DNA Fragmente:

- Initiale Denaturierung: 3 Min. bei 94°C
- Zyklus (40 X): 0,5 Min. bei 94°C
1 Min. bei 55°C
1,5 Min. bei 68°C
- abschließende Polymerisation: 7 Min. bei 68°C.

**Beispiel 8: Infektion humaner dendritischer Zellen mit
L. monocytogenes EGD und der attenuierten
Mutante L. monocytogenes Ahly2**

5 Da rekombinante Listerien als Vektorsystem im Rahmen einer
anti-Melanom-Vakzine in den Menschen eingesetzt werden sollen,
ist es notwendig, neben Untersuchungen im Tiermodell auch die
Wechselwirkung dieser Bakterien mit den humanen Zellen des
Immunsystems zu analysieren. Aus diesem Grund wurde die
10 Interaktion von *Listeria monocytogenes* EGD (Wildtypstamm)
sowie von weiteren attenuierten Stämmen mit humanen
dendritischen Zellen (DZ) untersucht. Nur DZ sind nach
Aufnahme einer Antigen-Vakzine in der Lage gegen das
betreffende Antigen eine primäre Immunantwort zu initiieren
15 (Banchereau et al., (1998), Nature 392, S. 245-252). Für eine
effiziente Belieferung der DZ mit der anti-Melanom-Vakzine ist
es daher notwendig, daß diese Zellen durch die Listerien
infiziert werden können. Zur Bestimmung der
Infektionseffizienz wurde das folgende Experiment
20 durchgeführt: Nach einem Standardprotokoll (Thurner et al.
(1999), J. Immunol. Methods 223, S. 1-15) wurden aus den
Zellen des peripheren Blutes in-vitro unreife DZ generiert,
die mit den Bakterien in einem Verhältnis von 1 (DZ) : 5
(Bakterien) infiziert wurden (d.h. 1×10^5 DZ wurden mit $5 \times$
25 10^5 Bakterien inkubiert). Um die Infektionseffizienz zu
erhöhen, wurde für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach
einer Stunde Inkubation wurde $10 \mu\text{g/ml}$ Gentamycin zu den
Kulturen addiert, um die extrazellulären Bakterien abzutöten.
Weitere 3 Stunden später wurden die DZ zweimal mit PBS
30 gewaschen und durch Inkubation mit 1% NP-40 PBS lysiert, um
die phagozytotisch aufgenommenen Bakterien freizusetzen. Zur
Bestimmung der Bakterienzahl wurden Aliquots des Lysats auf
Bakterien-Wuchagar ("Brain Heart Infusion Agar") plattiert.
Da jedes intakte Bakterium nach Inkubation eine Kolonie auf
35 dem Agar bildet, ist die Zahl der intrazellulären Bakterien
als Zahl der Kolonie-formenden Einheiten (CFU) definiert. Die
nachfolgende Tabelle 3 stellt das Ergebnis der
Infektionsexperimente dar, welche belegen, daß unreife humane

DZ effizient durch Listerien infiziert werden können.

Tabelle 3

	L. monocytogenes EGD (Wildtyp)	L. monocytogenes Ahly2 (Deletion des Listeriolysingens)
5		
10	CFU	
	2,94 x 10 ⁵	4,82 x 10 ⁴

15 **Beispiel 9: Bestimmung des Einflusses der Infektion auf den
Phänotyp von dendritischen Zellen**

Die Wechselwirkung unreifer DZ mit Bakterien kann zu ihrer
Ausreifung führen und damit einen positiven Einfluß auf ihre
20 Fähigkeit haben, T-Zellen zu stimulieren. Die Reifung der DZ
geht mit Veränderungen im Expressionsmuster spezifischer
Oberflächenmarker einher, d.h. die Expression spezifischer
Oberflächenmoleküle, die für die Stimulierung einer zellulären
Immunantwort essentiell sind, wird verstärkt. Dabei handelt es
25 sich um costimulatorische Moleküle wie CD40, CD80, CD86 oder
um Adhensionsmoleküle wie CD54. Das CD83-Oberflächenmolekül ist
ein spezifischer Marker für reife dendritische Zellen, dessen
Funktion allerdings noch unklar ist. Der Expressionsnachweis
dieser Oberflächenmarker erfolgt mittels Immunfluoreszenz im
30 Durchflußzytometer (FACS).

Um den Einfluß der Listeria-Infektion auf den Phänotyp humaner
DZ zu bestimmen, wurde wie folgt vorgegangen: Nach einem
Standardprotokoll (Thurner et al. (1999), J. Immunol. Methods
35 223, S. 1-15) wurden aus den Zellen des peripheren Blutes in-
vitro unreife DZ generiert, die mit L. monocytogenes EGD
Wildtypstamm-Bakterien in einem Verhältnis von 1 (DZ) : 5
(Bakterien) infiziert wurden (d.h. 1 x 10⁵ DZ wurden mit 5 x
10⁵ Bakterien inkubiert). Um die Infektionseffizienz zu
40 erhöhen, wurde für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach
einer Stunde Inkubation wurde 10 µg/ml Gentamycin zu den

Kulturen addiert, um die extrazellulären Bakterien abzutöten. Die Ansätze wurden dann für weitere 20 Stunden inkubiert. Als Kontrollen wurden Parallelkulturen verwendet, die uninfiziert gelassen wurden. Danach wurden die DZ geerntet und gewaschen.

5 Die Zellen wurden indirekt oder indirekt mit den folgenden monoklonalen Antikörpern inkubiert: FITC-konjugiertes anti-HLA-DR (Becton Dickinson, Heidelberg), anti-CD54 und PE-konjugiertes anti-CD83 (Coulter-Immunotech, Hamburg), PE-konjugiertes anti-CD80 (Pharmingen, Hamburg), FITC-

10 konjugiertes anti-CD40 und FITC-konjugiertes anti-CD86 (Cymbus Biotechnology, Dianova, Hamburg). FITC-konjugiertes anti-Maus-IgG (Dianova, Hamburg) wurde als sekundäres Reagenz für den anti-CD54-Nachweis verwendet. Maus-IgG wurde als Isotyp-Kontrolle verwendet. Die Analyse der Expression der

15 Oberflächenmarker auf den dendritischen Zellen wurde mittels Cytofluorometrie (FACScan, Fa. Becton Dickinson) durchgeführt. Das Ergebnis ist in Fig. 5 gezeigt. Diese Figur zeigt, daß es durch die Infektion zu einer verstärkten Expression spezifischer costimulatorischer Moleküle kommt. Desweiteren

20 kommt es durch die Infektion zu einer Ausreifung der DZ, sichtbar anhand der CD83-Expression. Diese Daten zeigen, daß die Infektion der DZ mit bakteriellen Vakzinvektoren einen positiven Effekt auf den Phänotyp der Antigen-präsentierenden Zellen hat.

Patentansprüche

- 5 1. Listeria-Expressionsvektor zur Immuntherapie, wobei der Listeria-Expressionsvektor folgende DNA-Sequenzen funktionell verknüpft umfaßt:
- (a) einen in Listeria aktiven Promotor; und
 - (b) eine für humane Tyrosinase, Trp-1, MelanA/MART-1 oder Trp-2 codierende DNA-Sequenz.
- 10 2. Listeria-Expressionsvektor nach Anspruch 1, wobei der in Listeria aktive Promotor der Promotor des hly-, actA-, plcA-, plcB- oder mpl-Gens ist.
- 15 3. Listeria-Expressionsvektor nach Anspruch 1 oder 2, zusätzlich eine ein Protein codierende DNA so enthaltend, daß ein ein Listeria-Protein und humane Tyrosinase, Trp-1, MelanA/MART-1 oder Trp-2 umfassendes Fusionsprotein codiert wird.
- 20 4. Expressionsvektor nach Anspruch 3, wobei das Listeria-Protein ein an der Lyse der Wirtsvakuolen oder an der Wanderung der Wirtszelle beteiligtes Enzym ist.
- 25 5. Expressionsvektor nach Anspruch 4, wobei das Listeria-Protein Listeriolysin O, PI-PLC oder ActA ist.
- 30 6. Expressionsvektor nach Anspruch 3, wobei das Listeria-Protein eine Signalsequenz eines sezernierten Listeria-Proteins umfaßt.
7. Expressionsvektor nach Anspruch 6, wobei die Signalsequenz von Haemolysin (Listeriolysin O), einer Phospholipase (PI-PLC) oder dem ActA-Protein stammt.
- 35 8. Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 1 bis 7, der von pKSV7, pAUL-A oder pLIGA160 stammt.

9. Rekombinantes attenuiertes *Listeria*-Bakterium, den *Listeria*-Expressionsvektor nach einem der Ansprüche 1 bis 8 enthaltend.

5 10. Rekombinantes attenuiertes *Listeria*-Bakterium nach Anspruch 9, das *Listeria monocytogenes* ist.

11. Impfstoff, ein rekombinantes attenuiertes *Listeria*-Bakterium nach Anspruch 9 oder 10 enthaltend.

10

12. Verwendung des rekombinanten attenuierten *Listeria*-Bakteriums nach Anspruch 9 oder 10 zur Immuntherapie.

15

13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei die Immuntherapie die Therapie des malignen Melanoms ist.

1/14

Tyrosinase:

Darstellung der cDNA-Kodierregion und der sich daraus ableitenden
Proteinsequenz

```
atgctcctggctggtttgtactgacctgctgtggagtttccagacctccgctggccatttc
1  -----+-----+-----+-----+-----+ 60
tacgaggaccgacaaaacatgacggacgacacctcaaaggtctggaggcgaccggtaaag

M L L A V L Y C L L W S F Q T S A G H F -

cctagagcctgtgtctcctctaagaacctgatggagaaggaatgctgtccaccgtggagc
61  -----+-----+-----+-----+-----+ 120
ggatctcggacacagaggagattcttggactacctcttcttacgacaggtggcacctcg

P R A C V S S K N L M E K E C C P P W S -

ggggacaggagtcctgtggccagctttcaggcagaggttctgtcagaatatccttctg
121  -----+-----+-----+-----+-----+ 180
ccctgtcctcaggacaccggtcgaaagtcctctccaaggacagtcttataggaagac

G D R S P C G Q L S G R G S C Q N I L L -

tccaatgcaccacttgggcctcaatttccttcacaggggtggatgaccgggagtcgtgg
181  -----+-----+-----+-----+-----+ 240
aggttacgtggtgaaccggagttaaagggaagtgtccccacctactggcctcagcacc

S N A P L G P Q F P F T G V D D R E S W -

ccttcctgtcttttataataggacctgccagtgtctgtgcaacttcattgggattcaactgt
241  -----+-----+-----+-----+-----+ 300
ggaaggcagaaaaatattatcctggacgggtcacgagaccgttgaagtaccctaagttgaca

P S V F Y N R T C Q C S G N F M G F N C -

ggaaactgcaagtttggttttggggaccaaactgcacagagagacgactcttggtgaga
301  -----+-----+-----+-----+-----+ 360
cctttgacgttcaaaccgaaaaccctggtttgacgtgtctctctgtgagaaccactct

G N C K F G F W G P N C T E R R L L V R -

agaaacatcttcgatttgagtgtcccccagagaaggacaaaatttttgcctacctcacttta
361  -----+-----+-----+-----+-----+ 420
tctttgtagaagctaaactcacggggtctcttctgtttaaaaaacggatggagtgaat

R N I F D L S A P E K D K F F A Y L T L -

gcaaagcataccatcagctcagactatgtcatcccatagggacctatggccaaatgaaa
421  -----+-----+-----+-----+-----+ 480
cgtttcgtatggtagtcgagtcgtgatacagtaggggtatccctggataccgggttacttt

A K H T I S S D Y V I P I G T Y G Q M K -
```

Fig. 1

aatggatcaacacccatgtttaacgacatcaatatttatgacctctttgtctggatgcat
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
ttacctagttgtgggtacaaattgctgtagttataaatactggagaaacagacctaggtta
N G S T P M F N D I N I Y D L F V W M H -

tattatgtgtcaatggatgcactgcttgggggatatgaaatctggagagacattgatttt
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
ataatacacagttacctacgtgacgaacccctataacttttagacctctctgtaactaaaa
Y Y V S M D A L L G G Y E I W R D I D F -

gccccatgaagcaccagcttttctgccttggcatagactcttcttgttgcggtgggaacaa
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
cggttacttcgtgggtcgaaaagacggaaccgtatctgagaagaacaacgccacccttggt
A H E A P A F L P W H R L F L L R W E Q -

gaaatccagaagctgacaggagatgaaaacttcactattccatattgggactggcgggat
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
ctttaggtcttcgactgtcctctacttttgaagtataaggtataaccctgaccgcccta
E I Q K L T G D E N F T I P Y W D W R D -

gcagaaaagtgtgacatttgcacagatgagtacatgggaggtcagcaccaccacaaatcct
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
cgtcttttcacactgtaaactgtctactcatgtaccctccagtcgtggggtgttttagga
A E K C D I C T D E Y M G G Q H P T N P -

aacttactcagcccagcatcattcttctcctcttggcagattgtctgtagccgattggag
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
ttgaatgagtcgggtcgtagtaagaagaggagaaccgtctaacagacatcggttaacctc
N L L S P A S F F S S W Q I V C S R L E -

gagtacaacagccatcagtcctttatgcaatggaacgcccagggacctttacggcgtaat
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
ctcatgttgtcggtagtcagaaatacgttaccttgcggtccctggaaatgccgcat
E Y N S H Q S L C N G T P E G P L R R N -

cctggaaaccatgacaaatccagaaccccaaggctcccctcttcagctgatgtagaattt
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
ggaccttttggtactgttttaggtcttgggggtccgaggggagaagtcgactacatcttaaa
P G N H D K S R T P R L P S S A D V E F -

Fig. 1 (Forts. 1)

tgctgagtttgacceaatatgaatctggtccatggataaagctgccaatttcagcttt
 961 -----+-----+-----+-----+-----+ 1020
 acggactcaaaactgggttatacttagaccaaggtacctatttcgacggttaaagtcgaaa
 C L S L T Q Y E S G S M D K A A N F S F -

 agaaatacactggaaggatttgctagtcacttactgggatagcggatgcctctcaaagc
 1021 -----+-----+-----+-----+-----+ 1080
 tctttatgtgaccttcctaaacgatcaggtgaatgaccctatcgctacggagagtttcg
 R N T L E G F A S P L T G I A D A S Q S -

 agcatgcacaatgccttgacatctatatgaatggaacaatgtcccaggtacagggatct
 1081 -----+-----+-----+-----+-----+ 1140
 tcgtacgtgttacggaacgtgtagatatacttaccttggttacaggggccatgtccctaga
 S M H N A L H I Y M N G T M S Q V Q G S -

 gccaacgatcctatcttctcttccaccatgcatttggtgacagtatttttgagcagtg
 1141 -----+-----+-----+-----+-----+ 1200
 cggttgctaggatagaagggaagaagtgggtacgtaaacactgtcataaaaactcgtcacc
 A N D P I F L L H H A F V D S I F E Q W -

 ctccgaaggcacgcctcttcaagaagtttatccagaagccaatgcacccattggacat
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+ 1260
 gaggcttccgtggcaggagaagttcttcaaataggtcttcggttacgtgggtaacctgta
 L R R H R P L Q E V Y P E A N A P I G H -

 aaccgggaatcctacatggttctctttataccactgtacagaaatgggtgatttctttatt
 1261 -----+-----+-----+-----+-----+ 1320
 ttggcccttaggatgtaccaaggaaaatattggtgacatgtctttaccactaaagaaataa
 N R E S Y M V P F I P L Y R N G D F F I -

 tcatccaaagatctgggctatgactatagctatctacaagattcagaccagactctttt
 1321 -----+-----+-----+-----+-----+ 1380
 agtaggtttctagaccgatactgatatcgatagatgttctaagtctgggtctgagaaaa
 S S K D L G Y D Y S Y L Q D S D P D S F -

 caagactacattaagtcctattttggaacaagcagtcggatctgggtcatggctccttggg
 1381 -----+-----+-----+-----+-----+ 1440
 gttctgatgtaattcaggataaaccttggttcgctcagcctagaccagtaccgaggaaccc
 Q D Y I K S Y L E Q A S R I W S W L L G -

Fig. 1 (Forts. 2)

```
gcggcgatggtaggggcccgtcctcactgccctgctggcagggcttgtagcttgctgtgt
1441 -----+-----+-----+-----+ 1500
cgccgctaccatccccggcaggagtgacgggacgaccgtcccgaacactcgaacgacaca

A A M V G A V L T A L L A G L V S L L C -

cgtcacaagagaaaagcagcttcctgaagaaaagcagccactcctcatggagaaagaggat
1501 -----+-----+-----+-----+ 1560
gcagtgttctcttttcgtcgaaggacttcttttcgtcggtgaggagtacctctttctccta

R H K R K Q L P E E K Q P L L M E K E D -

taccacagcttgtatcagagccatttataa
1561 -----+-----+-----+ 1590
atggtgtcgaacatagtctcggtaaatatt

Y H S L Y Q S H L * -
```

Fig. 1 (Forts. 3)

5/14

Trp-1:

Darstellung der cDNA-Kodierregion und der sich daraus ableitenden
Proteinsequenz

```

      atgagtgtcctaaactcctctctctgggctgtatcttcttccccttgctactttttcag
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      tactcacgaggatttgaggagagagacccgacatagaagaaggggaacgatgaaaaagtc

      M S A P K L L S L G C I F F P L L L F Q -

      caggccccgggctcaattcccaagacagtgtgccactgttgaggctttgagaagtggatg
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
      gtccggggcccgagttaagggttctgtcacacggtgacaactccgaaactcttcaccatac

      Q A R A Q F P R Q C A T V E A L R S G M -

      tgttggccagacctgtcccctgtgtctgggcctgggacagaccgctgtggctcatcatca
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
      acaacgggtctggacaggggacacagaccggaccctgtctggcgacaccgagtagtagt

      C C P D L S P V S G P G T D R C G S S S -

      gggaggggacagatgtgaggcagtgtgactgcagactcccggccccacagccctcagtatccc
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
      ccctccccgtctacactccgtcactgacgtctgagggccggggtgtcgggagtcataggg

      G R G R C E A V T A D S R P H S P Q Y P -

      catgatggcagagatgatcgggaggtctggcccttgcgcttcttcaataggacatgtcac
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
      gtactaccgtctctactagccctccagaccgggaacgcgaagaagtatatcctgtacagt

      H D G R D D R E V W P L R F F N R T C H -

      tgcaacggcaatttctcaggacacaactgtgggacgtgccgtcctggctggagaggagct
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
      acgttgccgttaaagagtccctgtgttgacaccctgcacggcaggaccgacctctcctcga

      C N G N F S G H N C G T C R P G W R G A -

      gcctgtgaccagaggggttctcatagtcaggagaaatcttctggacttaagtaaagaagaa
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
      cggacactgggtctcccaagagtatcagtcctctttagaagacctgaattcatttcttctt

      A C D Q R V L I V R R N L L D L S K E E -

      aagaaccactttgtccgggccctggatatggcaaagcgcacaactcaccctttatttgtc
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
      ttcttgggtgaaacaggcccgggacctataccgtttcgcggtgttgagtgggaaataaacag

      K N H F V R A L D M A K R T T H P L F V -

```

Fig. 2

attgccaccaggagatcagaagaaatactggggccagatggcaacacgccacaatttgag
481 -----+-----+-----+-----+-----+ 540
taacgggtggctcctctagtcttctttatgaccccggtctaccgttggtgcggtgttaaactc

I A T R R S E E I L G P D G N T P Q F E -

aacatttccatttataactactttgtttggacacactattactcagtcaaaaagactttc
541 -----+-----+-----+-----+-----+ 600
ttgtaaaggtaaataattgatgaaacaaacctgtgtgataatgagtcagtttttctgaaag

N I S I Y N Y F V W T H Y Y S V K K T F -

cttggggtaggacaggaaagctttgggtgaagtggatttctctcatgagggaccagctttt
601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660
gaaccccatcctgtcctttcgaaaccacttcacctaagagagtactccctgggtcgaaaa

L G V G Q E S F G E V D F S H E G P A F -

ctcacatggcacaggtaccacctcctgcgtctggagaaagacatgcaggaaatgttgcaa
661 -----+-----+-----+-----+-----+ 720
gagtgtaccgtgtccatgggtggaggacgcagacctctttctgtacgtcctttacaacgtt

L T W H R Y H L L R L E K D M Q E M L Q -

gagccttctttctcccttccttactggaattttgcaacggggaaaaatgtctgtgatatc
721 -----+-----+-----+-----+-----+ 780
ctcgggaagaaagagggaaggaatgaccttaaaacggttgcccctttttacagacactatag

E P S F S L P Y W N F A T G K N V C D I -

tgcacggatgacttgatgggatccagaagcaactttgattccactctaataagcccaaac
781 -----+-----+-----+-----+-----+ 840
acgtgcctactgaactaccctaggtcttcggtgaaactaagggtgagattattcgggtttg

C T D D L M G S R S N F D S T L I S P N -

tctgtcttttctcaatggcgagtggtctgtgactccttggagattatgataccctggga
841 -----+-----+-----+-----+-----+ 900
agacagaaaagagttaccgctcaccagacactgaggaaccttctaatactatgggacctt

S V F S Q W R V V C D S L E D Y D T L G -

acactttgtaacagcaccgaggatgggccaattaggagaaatccagctggaaatgtggcc
901 -----+-----+-----+-----+-----+ 960
tgtgaaacattgtcgtggctcctaccgggttaatcctcttttaggtcgacctttacaccgg

T L C N S T E D G P I R R N P A G N V A -

Fig. 2 (Forts. 1)

```

          agaccaatgggtgcaacgtcttcctgaaccacaggatgtcgctcagtgcttggaagttggt
961  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
          tctgggtaccacgttgcagaaggacttggtgtcctacagcgagtcacgaaccttcaacca

          R P M V Q R L P E P Q D V A Q C L E V G -

          ttatttgacacgcctcctttttattccaactctacaaacagtttccgaaacacagtgga
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
          aataaactgtgcgaggagaaaaataaggttgagatgtttgtcaaaggctttgtgtcacctt

          L F D T P P F Y S N S T N S F R N T V E -

          ggttacagtgacccacgggaaagtatgacctgtgttcgaagtcttcacaatttggt
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
          ccaatgtcactgggtgccccttcatactgggacgacaagcttcagaagtgtaaaccga

          G Y S D P T G K Y D P A V R S L H N L A -

          catctattcctgaatggaacagggggacaaaccatttgtctccaaatgatcctattttt
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
          gtagataaggacttaccttgtccccctgtttgggtaaacagaggtttactaggataaaaa

          H L F L N G T G G Q T H L S P N D P I F -

          gtctcctgcacaccttcacagatgcagtctttgatgaatggctgaggagatacaatgct
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
          caggaggacgtgtggaagtgtctacgtcagaaactacttaccgactcctctatgtttacga

          V L L H T F T D A V F D E W L R R Y N A -

          gatatatccacatttccattggaaaatgccctattggacataatagacaataacaatg
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
          ctatataggtgtaaaggtaaccttttacggggataacctgtattatctgttatgtgttac

          D I S T F P L E N A P I G H N R Q Y N M -

          gtgccattctggccccagtcaccaacacagaaatgtttgttactgctccagacaacctg
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
          cacggtaagaccgggggtcagtggttgtgtctttacaaacaatgacgaggtctgttggac

          V P F W P P V T N T E M F V T A P D N L -

          ggatacacttatgaaattcaatggccaagtcgggagtttagtgtacctgagataattgcc
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
          cctatgtgaatactttaagttaccggttcagccctcaaatcacatggactctattaacgg

          G Y T Y E I Q W P S R E F S V P E I I A -

```

Fig. 2 (Forts. 2)

atagcagtagttggcgctttgttactggttgcaactcatttttgggactgcttcttatctg
1441 -----+-----+-----+-----+ 1500
tatcgtcatcaaccgcgaaacaatgaccaacgtgagtaaaaccctgacgaagaatagac

I A V V G A L L L V A L I F G T A S Y L -

attcgtgccagacgcagtatggatgaagctaaccagcctctcctcactgatcagtatcaa
1501 -----+-----+-----+-----+ 1560
taagcacggtctgcgtcatacctacttcgattggcggagaggagtgactagtcatagtt

I R A R R S M D E A N Q P L L T D Q Y Q -

tgctatgctgaagaatatgaaaaactccagaatcctaatacagtcctgtggtctaa
1561 -----+-----+-----+-----+ 1614
acgatacgacttcttatactttttgaggtcttaggattagtcagacaccagatt

C Y A E E Y E K L Q N P N Q S V V * -

Fig. 2 (Forts. 3)

9/14

Trp-2:

Darstellung der cDNA-Kodierregion und der sich daraus ableitenden
Proteinsequenz

```

atgagccccctttggtgggggtttctgctcagttgcttgggctgcaaaatcctgccagga
1  -----+-----+-----+-----+-----+ 60
tactcgggggaaaccacccccaaagacgagtcacgaacccgacgttttaggacggtcct

M S P L W W G F L L S C L G C K I L P G -

gccaggggtcagttcccccgagtctgcatgacgggtggacagcctagtgaacaaggagtgc
61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
cgggtcccagtcgaagggggctcagacgtactgccacctgtcggatcacttgttcctcacg

A Q G Q F P R V C M T V D S L V N K E C -

tgcccacgcctgggtgcagagtcggccaatgtctgtggctctcagcaaggccgggggcag
121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
acgggtgcggacccacgtctcagccggttacagacaccgagagtcggttcggcccccgtc

C P R L G A E S A N V C G S Q Q G R G Q -

tgcacagaggtgcgagccgacacaaggccctggagtggtccctacatcctacaaaaccag
181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
acgtgtctccacgctcgggtgtgttcggggacctcaccagggatgtaggatgctttggtc

C T E V R A D T R P W S G P Y I L Q N Q -

gatgaccgtgagctgtggccaagaaaattcttcaccggacctgcaagtgcacaggaaac
241 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
ctactggcactcgacaccggttcttttaagaagggtggcctggacgttcacgtgtcctttg

D D R E L W P R K F F H R T C K C T G N -

tttgccggtataattgtggagactgcaagtttggctggaccggtcccaactgcgagcgg
301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
aaacggccgatattaacacctctgacgttcaaaccgacctggccagggttgacgtcgc

F A G Y N C G D C K F G W T G P N C E R -

aagaaaccaccagtgattcggcagaacatccattccttgagtcctcaggaaagagagcag
361 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
ttctttggtggtcactaagccgtctttaggttaaggaactcaggagtcctttctctcgtc

K K P P V I R Q N I H S L S P Q E R E Q -

ttcttgggcgccttagatctcgcgaagaagagagtacaccccgactacgtgatcaccaca
421 -----+-----+-----+-----+-----+ 480
aagaaccgcggaatctagagcgcttcttctctcatgtggggctgatgcactagtggtgt

F L G A L D L A K K R V H P D Y V I T T -

```

Fig. 3


```

caacactggctgggcctgcttggggcccaatggaacccagccgcagtttgccaactgcagt
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 540
gttgtgaccgacccggacgaacccgggttaccttgggtcggcgtcaaacggttgacgtca

Q H W L G L L G P N G T Q P Q F A N C S -

gtttatgattttttgtgtggctccattattattctgtagagatacattattaggacca
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 600
caaataactaaaaaacacaccgaggttaataataagacaatctctatgtaataatcctggt

V Y D F F V W L H Y Y S V R D T L L G P -

ggacgcccctacagggccatagatttctcacatcaaggacctgcatttggttacctggcac
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 660
cctgcggggatgtcccgggtatctaaagagtgtagttcctggacgtaaacaatggaccgtg

G R P Y R A I D F S H Q G P A F V T W H -

cggtaccatttgttgtgtcttggaagagatctccagcgactcattggcaatgagtcctttt
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
gccatggtaaacacacagacctttctctagaggtcgctgagtaaccggttactcagaaaa

R Y H L L C L E R D L Q R L I G N E S F -

gctttgcctactggaactttgccactgggaggaacgagtgatgtgtgtacagaccag
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
cgaaacgggatgaccttgaaacggtgaccctccttgctcacactacacacatgtctggtc

A L P Y W N F A T G R N E C D V C T D Q -

ctgtttggggcagcgagaccagacgatccgactctgattagtcggaactcaagattctcc
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
gacaaaccccgctcgctctgggtctgctaggctgagactaatcagccttgagttctaagagg

L F G A A R P D D P T L I S R N S R F S -

agctgggaaactgtctgtgatagcttggatgactacaaccacctggtcaccttgtgcaat
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
tcgaccctttgacagacactatcgaacctactgatgttggtggaccagtggaacacgtta

S W E T V C D S L D D Y N H L V T L C N -

ggaacctatgaaggtttctgtagaagaaatcaaattgggaagaaacagcatgaaattgccca
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
ccttggatacttccaaacgactcttcttttagtttacccttctttgtcgtactttaacggt

G T Y E G L L R R N Q M G R N S M K L P -

```

Fig. 3 (Forts. 1)

11/14

```

accttaaaagacatacgagattgcctgtctctccagaagtttgacaatcctcccttcttc
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
tggaattttctgtatgctctaacggacagagaggtcttcaaactgttaggagggagaag

T L K D I R D C L S L Q K F D N P P F F -

cagaactctaccttcagtttcaggaatgctttggaagggttgataaagcagatgggact
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
gtcttgagatggaagtcaaagtccttacgaaaccttcccaaactatttcgtctaccctga

Q N S T F S F R N A L E G F D K A D G T -

ctggattctcaagtgatgagccttcataatttggttcattccttcctgaacgggacaaac
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
gacctaagaggttcactactcggaagtattaaaccaagtaaggaaggacttgcctgtttg

L D S Q V M S L H N L V H S F L N G T N -

gctttgccacattcagccgccaatgatcccatTTTTgtggttcttcattcctttactgat
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
cgaaacggtgtaagtcggcggttactagggtaaaaacaccaagaagtaaggaaatgacta

A L P H S A A N D P I F V V L H S F T D -

gccatctttgatgagtggatgaaaagatttaatcctcctgcagatgcctggcctcaggag
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
cggtagaaaactactcacctacttttctaaattaggaggacgtctacggaccggagtcctc

A I F D E W M K R F N P P A D A W P Q E -

ctggcccctattggtcacaatcggatgtacaacatgggttcctttcttccctccagtgact
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
gaccgggggataaaccagtgttagcctacatgttgtaggaaggaaagaaaggaggtcactga

L A P I G H N R M Y N M V P F F P P V T -

aatgaagaactctttttaacctcagaccaacttggtacagctatgccatcgatctgcca
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
ttacttcttgagaaaaattggagtcgtggttgaaaccgatgtcgatacggtagctagacggt

N E E L F L T S D Q L G Y S Y A I D L P -

gtttcagttgaagaaactccaggttggtcccaactctcttagtagtcatgggaacactg
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
caaagtcaacttctttgaggtccaaccgggtgttgagagaatcatcagtacccttgtgac

V S V E E T P G W P T T L L V V M G T L -

```

Fig. 3 (Forts. 2)

gtggctttggttggtctttttgtgctggttggtttttcttcaatatagaagacttcgaaaa
1441 -----+-----+-----+-----+-----+ 1500
caccgaaaccaaccagaaaaacacgacaaccgaaaagaagttatatcttctgaagctttt

V A L V G L F V L L A F L Q Y R R L R K -

ggatatacacccctaattggagacacatttaagcagcaagagatacacagaagaagcctag
1501 -----+-----+-----+-----+-----+ 1560
cctatatgtggggattacctctgtgtaaattcgtcgttctctatgtgtcttcttcggatc

G Y T P L M E T H L S S K R Y T E E A * -

Fig. 3 (Forts. 3)

MART-1/MelanA:

Darstellung der cDNA-Kodierregion und der sich daraus ableitenden
Proteinsequenz

```

      ATGCCAAGAGAAGATGCTCACTTCATCTATGGTTACCCCAAGAAGGGGCACGGCCACTCT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      TACGGTTCTCTTCTACGAGTGAAGTAGATACCAATGGGGTTCTTCCCGTGCCGGTGAGA

      M P R E D A H F I Y G Y P K K G H G H S -

      TACACCACGGCTGAAGAGGCCGCTGGGATCGGCATCCTGACAGTGATCCTGGGAGTCTTA
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
      ATGTGGTGCCGACTTCTCCGGCGACCCTAGCCGTAGGACTGTCACTAGGACCCTCAGAAT

      Y T T A E E A A G I G I L T V I L G V L -

      CTGCTCATCGGCTGTTGGTATTGTAGAAGACGAAATGGATACAGAGCCTTGATGGATAAA
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
      GACGAGTAGCCGACAACCATAACATCTTCTGCTTTACCTATGTCTCGGAACTACCTATTT

      L L I G C W Y C R R R N G Y R A L M D K -

      AGTCTTCATGTTGGCACTCAATGTGCCTTAACAAGAAGATGCCACACAAGAAGGGTTTGAT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
      TCAGAAGTACAACCGTGAGTTACACGGAATTGTTCTTCTACGGGTGTTCTTCCCAAACCTA

      S L H V G T Q C A L T R R C P Q E G F D -

      CATCGGGACAGCAAAGTGTCTCTTCAAGAGAAAACTGTGAACCTGTGGTTCCCAATGCT
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
      GTAGCCCTGTCGTTTCACAGAGAAGTTCTCTTTTGACACTTGGACACCAAGGGTTACGA

      H R D S K V S L Q E K N C E P V V P N A -

      CCACCTGCTTATGAGAACTCTCTGCAGAACAGTCACCACCACCTTATTCACCTTAA
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 357
      GGTGGACGAATACTCTTTGAGAGACGTCTTGTCAGTGGTGGTGAATAAGTGGGAATT

      P P A Y E K L S A E Q S P P P Y S P * -

```

Fig. 4

14/14

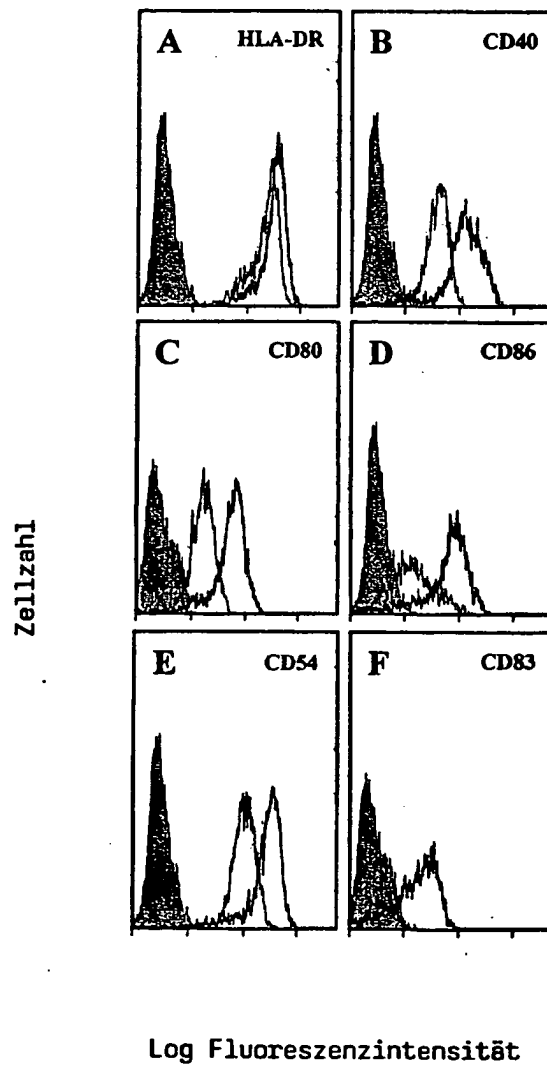


Fig. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 00/03629A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/75 A61K39/02 C12N1/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 34007 A (SCHERING AG) 8 July 1999 (1999-07-08) the whole document	1-13
Y	WO 99 25376 A (UNIV PENNSYLVANIA) 27 May 1999 (1999-05-27) the whole document	1-13
Y	WO 96 14087 A (UNIV PENNSYLVANIA) 17 May 1996 (1996-05-17) the whole document	1-13



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

8 document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 March 2001

Date of mailing of the international search report

27/03/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hillenbrand, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/03629

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9934007 A	08-07-1999	US 6143551 A AU 2054799 A BR 9814546 A EP 1042495 A	07-11-2000 19-07-1999 10-10-2000 11-10-2000
WO 9925376 A	27-05-1999	US 6099848 A AU 1410899 A EP 1032417 A	08-08-2000 07-06-1999 06-09-2000
WO 9614087 A	17-05-1996	US 6051237 A EP 0790835 A JP 10509448 T	18-04-2000 27-08-1997 14-09-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ernationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/03629

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/75 A61K39/02 C12N1/21

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 99 34007 A (SCHERING AG) 8. Juli 1999 (1999-07-08) das ganze Dokument	1-13
Y	WO 99 25376 A (UNIV PENNSYLVANIA) 27. Mai 1999 (1999-05-27) das ganze Dokument	1-13
Y	WO 96 14087 A (UNIV PENNSYLVANIA) 17. Mai 1996 (1996-05-17) das ganze Dokument	1-13

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. März 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

27/03/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hillenbrand, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/03629

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9934007 A	08-07-1999	US 6143551 A AU 2054799 A BR 9814546 A EP 1042495 A	07-11-2000 19-07-1999 10-10-2000 11-10-2000
WO 9925376 A	27-05-1999	US 6099848 A AU 1410899 A EP 1032417 A	08-08-2000 07-06-1999 06-09-2000
WO 9614087 A	17-05-1996	US 6051237 A EP 0790835 A JP 10509448 T	18-04-2000 27-08-1997 14-09-1998